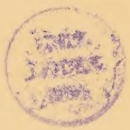
DER EINFLUSS VON APYRASE AUF DIE HAF-INDUZIERTE THROMBOZYTENSTIMULATION

UDO LEHMANN

Diss. Frankfurt am Main
1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523703_0010

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Abteilung für Angiologie
(Leiter: Prof. Dr. K. Breddin)

DER EINFLUSS VON APYRASE AUF DIE HAF-INDUZIERTE THROMBOZYTENSTIMULATION

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Udo Lehmann
aus Pfaffengrün

Frankfurt am Main 1984

Dekan: Prof. Dr. H. J. Müller
Referent: Prof. Dr. K. Breddin
Korreferent: Prof. Dr. Dr. F. Kreter
Tag der mündlichen Prüfung: 27.9.1984

Gewidmet meiner Mutter
Maria Lehmann
geb. Petter

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1) EINLEITUNG	1
2) MATERIAL UND METHODIK	
2.1) Herstellung des Fettgewebsextraktes	3
2.2) Blutentnahme und Versetzung des Blutes mit Fettgewebsextrakt	4
2.3) Mikroskopische Auswertung des Thrombozytenformwandels	6
2.4) Ultrafiltration	9
2.5) Wirkung des Enzyms Apyrase auf die HaF-Aktivität	10
2.6) ADP- und Kollagen induzierte Aggregation	11
2.7) Retentionstest nach Hellem II modifiziert nach Sayegh	14
2.8) Volumenverteilung	16
3) ERGEBNISSE	
3.1) HaF- (homogenisiert) und HaF (gepreßt) induzierter Thrombozytenformwandel nach ein-, fünf-, fünfzehn- und dreißigminütiger Inkubation mit 40ul/1ml Citratblut bei 37°C	18
3.2) Aktivitätsprüfung des Gewebeextraktes nach Apyrase-Einwirkung	22
3.3) Ultrafiltration des Extraktes nach 4stündiger Apyrase-Einwirkung	26
3.4) Retentionstest nach Hellem II, modifiziert nach Sayegh	30
3.5) ATP- und ADP induzierter Thrombozytenformwandel in den Konzentrationen 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}.	32

Seite

4) DISKUSSION 37

5) ZUSAMMENFASSUNG 46

6) LITERATURVERZEICHNIS 48

7) ANHANG 52

1) E I N L E I T U N G

Als Formwandel bezeichnet man die Formveränderung bei Thrombozyten, sie quellen und bilden Fortsätze aus.
Diese Reaktion ist temperaturabhängig. Bei einer Blutentnahme wandeln sich 15-20% der Thrombozyten bei 37°C im Zitratblut um.
Nach Fehlpunktionen und Aspiration von Gewebssaft aus dem subcutanem Fettgewebe ist sofort eine bis zu 100%ige Formveränderung der Thrombozyten festzustellen.
Deshalb wurden Extrakte aus subcutanem Fettgewebe hergestellt.

Die im Fettgewebsextrakt enthaltene Aktivität wird als Startsubstanz für die primäre Hämostase angesehen und deshalb auch Hämostase aktivierender Faktor (HaF) genannt.

Die formwandelnde Wirkung des HaF ist nicht identisch mit anderen Substanzen die den Formwandel auslösen, wie ADP und Kollagen. HaF wirkt zwar formwandelstimulierend, aber nicht aggregationsinduzierend.

HaF steigert die Empfindlichkeit der Thrombozyten für ADP und Kollagen. Das Retentionsverhalten der Thrombozyten wird durch HaF stark erhöht (Kirchmaier 1979).

Bei Raumtemperatur ist HaF 1-2 Wochen aktiv, tiefgefroren aber bis über 45 Tage ohne Aktivitätsverlust zu erhalten (Kirchmaier 1979).

HaF enthält geringe Mengen an ADP (maximal 10^{-9}Mol) und andere Nukleotide.
Um einen möglichen additiven Effekt von HaF auf die Nukleotidenwirkung zu untersuchen, verdauten wir die Gewebeextrakte mit Apyrase, einem Enzym das im Kartoffelextrakt vorkommt und ADP und ATP hydrolytisch spaltet (Kalckar 1944).

Ferner untersuchten wir, ob die HaF-Aktivität selbst durch Apyrase zerstört wird und ob Apyrase eine Plättchenstimulationshemmende Funktion in unseren Testsystemen (HaF-induzierter Formwandel und HaF-induzierte Retention) besitzt.

2) M A T E R I A L u n d M E T H O D I K

2.1) Herstellung des Fettgewebsextraktes

Material

1) frisches Fettgewebe vom Schwein
2) Propanol (Fa. Merck) 30%, Aqua dest.
3) Homogenisator Ultra Turrax IKA Stauffen
4) Knoblauchpresse
5) dünner Plastikschlauch zum Absaugen
6) Zentrifugationsgläser
7) Zentrifuge (MSE)
8) Rotationskolben (aus Glas mit Schliff)
9) Büchi Rotavapor (2377)

Herstellung von HaF nach zwei Methoden

A) Homogenisation
1 Teil subcutanes Fettgewebe (Schwein) wurde unter Kühlung ($0^{\circ}C$) in 4 Teilen 30%igem Propanol mittels eines Homogenisators-Ultra Turrax IKA Stauffen homogenisiert.

B) Pressen des Fettgewebes
geschah mittels einer Knoblauchpresse.

Anschließend wurden beide Mengen bei 1500g 25 Minuten zentrifugiert, wobei sich 4 Sedimentationsschichten bildeten (siehe Abb. 1), von denen die aktivere mittlere zur Weiterverarbeitung entnommen wurde. Anschließende Zentrifugation bei plus $4^{\circ}C$ mit 2000G über 30 Min. der mittleren Schicht, die die formwandelstimulierende Aktivität enthält. Verwendet wurde der Überstand nach Kryopräzipitation.

Nach Tieffrieren bei minus 50°C und 30minütiger Aufbewahrung wurde im Wasserbad von genau 4°C 30 Min. lang aufgetaut. Die Proteine und Kollagenfasern werden dabei gefällt und der Überstand zur Weiterverarbeitung abgesaugt.

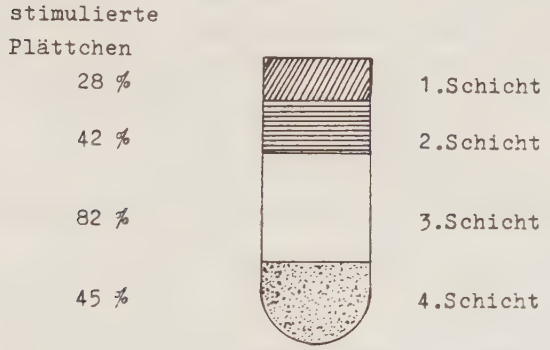


Abb. 1 Verteilung der Formwandel-stimulierenden Aktivität in den verschiedenen Zonen nach Zentrifugation (1500g, 25Min.)

2.2) Blutentnahme und Versetzung des Blutes mit Fettgewebsextrakt.

Material

1) verschiedene Einmalspritzen aus Kunststoff
2) sterile Einmalkanülen (1,1mm)
3) 3,8%ige Natriumcitratlösung
4) 6%ige Glutaraldehydlösung, gepuffert mit Sörensen-Phosphatpuffer auf pH 7,4
5) Wasserbad 37°C
6) Polystyrolröhrchen (12ml Fassungsvermögen)
7) 40µl Eppendorf Pipette
8) Stoppuhr
9) Zentrifuge (MSE High Speed 18)

Blutentnahme

Nach kurzer venöser Stauung mit einer Staubinde am Oberarm und Reinigung der Punktionsstelle mit 70%igem Alkohol, wurde eine große Vene im Bereich der Cubitalregion mit einer 1,1mm starken Kanüle punktiert. Das Blut wurde unter leichtem Zug in den Spritzenzylinder gefördert; darin befand sich als Vorlage 3,8%ige Natriumcitratlösung. Das Mischungsverhältnis war 1 Teil Citratlösung auf 9 Teile Vollblut.

Folgende Blutmengen wurden für die Versuche benötigt:

a) 10ml Citratblut (1Teil=1,0ml 3,8%ige Natriumcitratlösung auf 9 Teile Vollblut) für die Untersuchung des HaF-induzierten Thrombozytenformwandels.

b) 3ml Citratblut für den Thrombozytenretentionstest nach Hellem II, modifiziert nach Sayegh.

c) 5ml Citratblut für den ATP- und ADP induzierten Thrombozytenformwandel.

Gewebsextrakt induzierter Formwandel

Vor der Blutentnahme wurden in 4 Polystyrolröhrchen 4ml gepufferter Glutaraldehyd 6%ig, pH 7,4 pipettiert und auf 37°C erwärmt.
Weitere 4 Röhrchen wurden vorher mit je 40µl HaF beschickt, mit 1', 5', 15' und 30 Min. beschriftet und ebenfalls bei 37°C erwärmt.
Ein weiteres Röhrchen diente als Reservoir für das Blut.

Daraus wurde jeweils 1ml in jedes der 4 mit Haf beschickten Röhrchen überpipettiert.
Nach 1', 5', 15' und 30 Min. Inkubation des Citratblutes mit HaF wurden die Plättchen mit jeweils 4ml vorgewärmten Glutaraldehyd (pH 7,4 6%ig) fixiert. Der Inhalt der Röhrchen wurde sofort durchmischt und anschließend 1,5 Min. bei 150 g zentrifugiert.

2.3) Mikroskopische Auswertung der Thrombozyten

Material

1) Polystyrolröhrchen (12ml Fassungsvermögen) die das plättchenreiche Plasma enthalten.
2) Glasobjektträger, Deckgläser, Immersionsöl
3) Leitz-Interferenz-Kontrastmikroskop (Laborlux)
4) Eppendorf-Pipette

Ausführung

Der Inhalt der Polystyrolröhrchen wurde bis auf ca. 1ml vorsichtig dekantiert, nochmals gemischt, um eine homogene Thrombozytensuspension zu erhalten. Mit einer Eppendorf-Pipette wurden 20ul des Gemisches entnommen und auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und Immersionsöl aufgetragen.
Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Leitz-Interferenz-Kontrastmikroskop bei 1250-facher Vergrößerung (Objektiv 100x, Ocular 12,5x).

Beurteilung des Formwandels

Die Thrombozyten werden in zwei Gruppen eingeteilt.
1) - nicht formverändert
2) - primär formverändert (Reizform)

Nicht formverändert = Plättchen die scheibenförmig und deren Oberfläche keine Fortsätze (Pseudopodien) erkennen lassen.

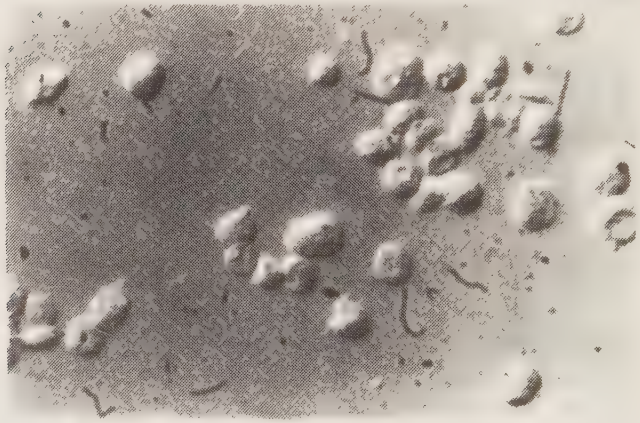


Abb: 2 Nicht formveränderte Blutplättchen unter dem Interferenz - Kontrastmikroskop bei 1250-facher Vergrößerung.

Formverändert = Plättchen die kugelförmig und deren Oberfläche einen oder mehrere Fortsätze erkennen lassen.

Abb: 3 Formveränderte Blutplättchen unter dem Interferenz - Kontrastmikroskop bei 1250-facher Vergrößerung. Der Pfeil in Bildmitte weist auf einige typische Pseudopodienbildungen.

Für die Beurteilung des Formwandels wurden 2 x 100 Thrombozyten ausgezählt, nach, nicht formveränderten bzw. formveränderten differenziert und in Prozenten angegeben.

$$FW = \frac{200 \text{ Thrombozyten} - \text{unveränderte}}{2} = \% \text{ formveränderte Plättchen}$$

2.4) Ultrafiltration

Material

1) Plättchenreiches Plasma (PRP)
2) Fettgewebsextrakt
3) Apyrase - mit einem pH - Optimum (6,5) und einem Temperatur-Optimum (30°C) (Fa. Sigma Chemicals Company, USA)
4) Papierfilter, Typ CF 25 (Fa. Amicon)
5) Reagenzgläser
6) Zentrifuge

Prinzip

Apyrase wird aus dem Gewebesextrakt mittels eines Papierfilters, durch zentrifugieren, herausgefiltert.
Der Filter CF 25 besitzt eine Porengröße von 25.000 MW, Apyrase hat eine Größe von
MW, sodaß Apyrase im Filter verbleibt.

Ausführung

Der Gewebsextrakt wurde auf einen pH von 6,5 gepuffert und 4 Stunden in einem 30°C warmen Wasserbad der Wirkung von Apyrase ausgesetzt. Anschließend wurde das Gewebsextrakt - Apyrase-Gemisch ultrafiltriert.

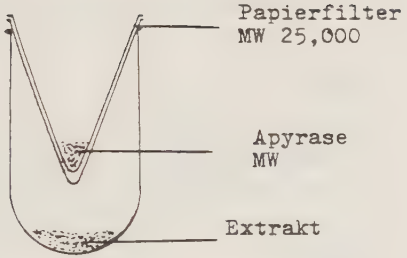


Abb: 4 Schematische Darstellung der Ultrafiltration

2.5) Wirkung des Enzyms Apyrase auf die HaF - Aktivität

Material

1) Plättchenreiches Plasma
2) Fettgewebsextrakt
3) Apyrase
4) Wasserbad
5) Reagenzröhrchen
6) Eppendorfpipette

Prinzip

Apyrase, ein Enzym das aus Kartoffeln gewonnen wird und aufgrund ihrer ATP - ase und ADP-ase Aktivität eine gerinnungshemmende Wirkung entfaltet.

Ausführung

Apyrase (Pulverform) wurde zuerst im Verhältnis 10mg Apyrase zu 400µl Aqua dest. gemischt.
In einem auf 30°C erwärmten Wasserbad wurde in einem Polystyrolröhrchen 1ml HaF, pH 6,5 mit 100ul Apyrase vermischt und 4 Stunden auf 30°C erwärmt gehalten.

2.6) ADP- und Collagen- induzierte Aggregation

Material

1) Universialaggregometer (Fa. Braun, Melsungen) mit einem Photometer Eppendorf
2) Kompensationsschreiber Eppendorf Nr. 6511
3) Meßröhrchen aus Polyvinylchlorid (Fa. Greiner, Nürtingen)
4) Rührmagnet, Teflon überzogen (Fa. Fischer, Ffm.)
5) Automatische Pipette für 10µl
6) Collagenreagenz "Horm" (Hormonchemie, München)
7) ADP (Fa. Böhringer, Mannheim)
8) Einmalspritzen aus Kunststoff
9) sterile Einmalkanüle (1,1mm)
10) 3,8%ige Natriumcitratlösung
11) Polystyrolröhrchen (12ml Fassungsvermögen)
12) Zentrifuge (MSE High Speed 18)

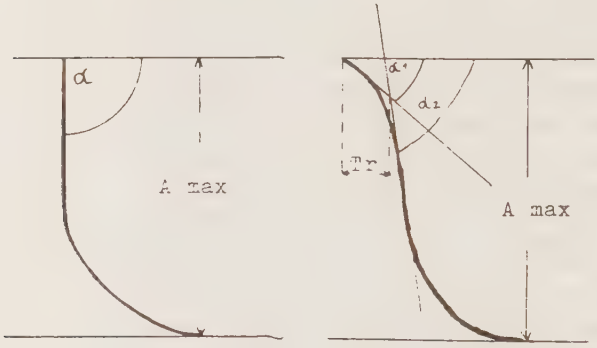
Prinzip

Im Photmeter wird die ADP- und Collagen- induzierte Aggregation mittels eines Schreibers durch die Abnahme der optischen Dichte bzw. der Extinktion registriert.
Die Abnahme der optischen Dichte erfolgt durch Verringerung der freien Thrombozyten im PRP durch Aggregatbildung. Die Aggregate sinken zu Boden.

Ausführung

Die Messung der ADP- und Collagen- induzierten Aggregation erfolgte 30 - 45 Minuten nach der Blutentnahme.
1ml PRP wurde in ein auf 37°C vorgewärmtes, silikonisiertes Glasröhrchen pipettiert, in dem sich ein kleiner teflonbeschichteter Rührmagnet befand, der von einem Elektromagneten im Gerät über ein rotierendes magnetisches Kraftfeld schnell bewegt wurde. Dies hatte eine schnellere Durchmischung des PRP zur Folge.
Das Meßröhrchen wird in den Halterungsblock gestellt und das Photometer auf den Extinktionswert 0,9 eingestellt.
Nach Einschalten des Rührmotors und des Kompensationsschreibers (Papiervorschub 1cm/Min.) wurde mit einer Hamilton - Pipette 10ul des aggregationsauslösenden ADP - oder Collagens zugesetzt, das dementsprechend 100-fach höher konzentriert sein mußte, als die gewünschte Endkonzentration im PRP.
Beim Eintauchen der Pipettenspitze registrierte der Schreiber durch einen etwas größeren Ausschlag den Beginn der Aggregationskurve.
Es wurde der zeitliche Extinktionsabfall registriert, da durch Aggregatbildung die Anzahl der freien Plättchen verrringert wurde und dadurch die optische Dichte abnahm.
Der Aggregationsvorgang wurde mindestens 5 Min. lang registriert.

Die Auswertung der vom Kompensationsschreiber aufgezeichneten Kurvenbilder (s. unter Abb.5 und 6) erfolgt in der im Beispiel a und b angegebenen Weise.



Beispiel a Beispiel b

Abb. 5 u. 6

Unter Beispiel a handelt es sich um eine ADP- induzierte Aggregation. Als Meßwerte erscheinen die maximale Aggregation (A max), der Winkel α als Maß der maximalen Aggregationsgeschwindigkeit, sowie die Aggregationszeit bis zum Erreichen der maximalen Aggregation.

Unter Beispiel b handelt es sich um eine Collagen-induzierte Aggregation.
Als Meßwerte erscheinen die maximale Aggregation (A max), die Winkel α_1 und α_2, sowie Messung der TR - Zeit = Strecke zwischen Collagenzugabe und Schnittpunkt der Winkel α_1 und α_2 bildenden Tangenten.

2.7) Retentionstest nach Hellem II modifiziert nach Sayegh

Material

1) Harvard Infusionspumpe Nr. 901
2) 5ml Einmalspritzen und Einmalkanülen (1,1mm)
3) EDTA- beschichtetes Kunststoffröhrchen
4) Polyäthylenschläuche (Fa. Fischer, Ffm.)
Länge 15 cm, Innen Ø 2 mm, Außen Ø 3 mm
5) Glasperlen 0,25 - 0,3 mm Ø (Fa. Braun,Melsungen)
6) poröses Nylonläppchen zur Abdichtung
7) Ultra - Flow-100 zur Thrombozytenzählung

Prinzip

Das Blut wird mittels einer Pumpe konstant durch einen Glasperlenfilter gepreßt.
Die Differenz der Plättchenzahl vor und nach dem Glaskontakt repräsentiert die Adhäsivität der Plättchen, die in % als prozentuale Retension angegeben wird.

$$\text{Ret. \%} = \frac{\text{Vorwert - Perfusionswert}}{\text{Vorwert}} \times 100$$

Herstellung der Glasperlenfilter

Die Glasperlen werden mit Aqua dest. mehrfach gespült und bei 100°C getrocknet. Ohne Druck füllt man die Glasperlen nun in den Polyäthylenschlauch ein, der auf einer Seite bereits mit einem Kunststoff-Reduzieradapter und einer zwischen Schlauch und Adapter gelegenen Kunststoff-Filter-Gaze verschlossen war.

Die noch offene Seite des Filterschlauches wird in gleicher Weise mittels Filter-Gaze und Kunststoffadapter verschlossen.
Zur besseren Fixierung der Adapter an den Schlauch wird dieser vor Aufschieben der Adapter mit Uhu-Plast^{R} bestrichen. Der Adapter der einen Schlauchseite paßt auf den Konus der Perfusorspritze.

Ausführung

In einer 3ml Kunststoffspritze befanden sich 0,3ml 3,8%ige Natriumcitratlösung und 0,3ml formwandelstimulierender Gewebsextrakt.
Auch wurde eine Versuchsserie ohne Gewebsextrakt durchgeführt.
Durch mehrmaliges Schwenken des Spritzenzylinders, wobei der Spritzenstempel etwas zurückgezogen wurde, wurden Blut, Na-Citrat und Gewebsextrakt durchmischt. Anschließend ließ man 1ml aus der Spritze ohne Filterpassage in ein EDTA-beschichtetes Röhrchen tropfen (0-Wert). Danach setzt man die Spritze bereits in die Pumpe und verbindet sie mit dem Kunststoffreduzieradapter des Glasperlenfilters.
Nach Passage des Filters (Durchflußgeschwindigkeit 1,36ml/Min.-Stufe III) wurde das Blut zur Plättchenzählung im EDTA-Röhrchen aufgefangen (Perfusionswert).

Die Zählung wurde mit einem Ultra-Flow 100 vorgenommen. Es wurden 10µl EDTA-Blut in 9,1ml Verdünnungslösung pipettiert und der Vorwählschalter auf 9,99 gestellt. Das Ergebnis wurde mit 0,75 und 1000 multipliziert.

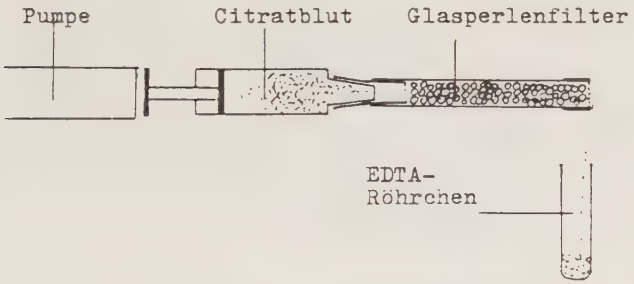


Abb: 7 Schematische Darstellung eines Perfusors mit Glasperlenfilter.

2.8) Volumenverteilung

Apparatur

1) Elektronisches Partikelzählgerät Ultra-Flow 100 Vertrieb: Becton-Dickinson Laborsyteme, Neidenstein BRD

2) Mehrkanalanalysator ND 60 (Fa. Nuclear Data GmbH, Pfm.)

3) Commodore Rechner 8030 (Fa. Commodore GmbH, Neu-Isenburg)

Prinzip

Die im Ultra-Flow 100 erzeugten Analogsignale wurden an den ND 60 weitergegeben, dort digitalisiert und Größenverteilungskurven erstellt. Diese Histogramme wurden nach einem Basisprogramm des Commodore 8030 weiterverarbeitet und ausgedruckt.

Beurteilung

Die Volumenverteilungskurvenvom ND 60 wurden mit den Ergebnissen der optischen Auszählung verglichen. Die Histogramme von Citratblut ohne formverändernde Substanzen wurden als Normkurven herangezogen und mit den Volumenverteilungskurven, die formverändernde Substanzen enthielten, bezüglich einer Kurvenabweichung verglichen.

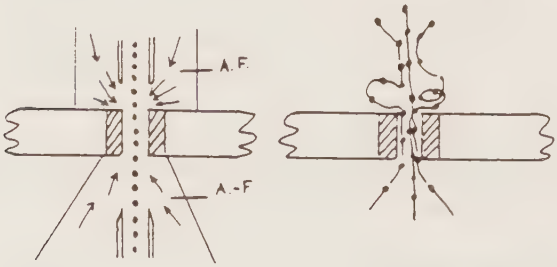


Abb: 8 Schema der hydrodynamisch fokusierten Kammer mit gerichtetem Partikeltransport (a) und der nichtfokusierten Kammer (b).
A.-F. = Flüssigkeitssegmente (Abschirm-Flüssigkeit)

3) E R G E B N I S S E

3.1) HaF-(homogenisiert) und HaF (gepreßt) induzierter Thrombozytenformwandel nach ein-, fünf-, fünfzehn- und dreißigminütiger Inkubation mit 40ul HaF/1ml Citratblut bei 37°C.

HaF (homogenisiert) hat die höhere Aktivität gegenüber HaF (gepreßt).
Beträgt der Unterschied bei 1Min. Inkubation nur 17,6%, so beträgt er bei 5Min. und 15Min. schon ca. 48% sinkt dann aber bei 30Min. wieder auf 26% (formveränderte Thrombozyten) ab.
Die Median-Werte der Volumenverteilung sind bei HaF (homogenisiert) auch höher als bei HaF (gepreßt).
Bei 1Min. Inkubation 2,8%, bei 5Min. 5,2% und bei 15Min. 3,5%. Nur beim 30Min. Wert sind beide Werte identisch. Siehe Anhang und Abb. 9 - 11

Abb. 9

Volumenverteilung nach Gewebeextraktzugabe

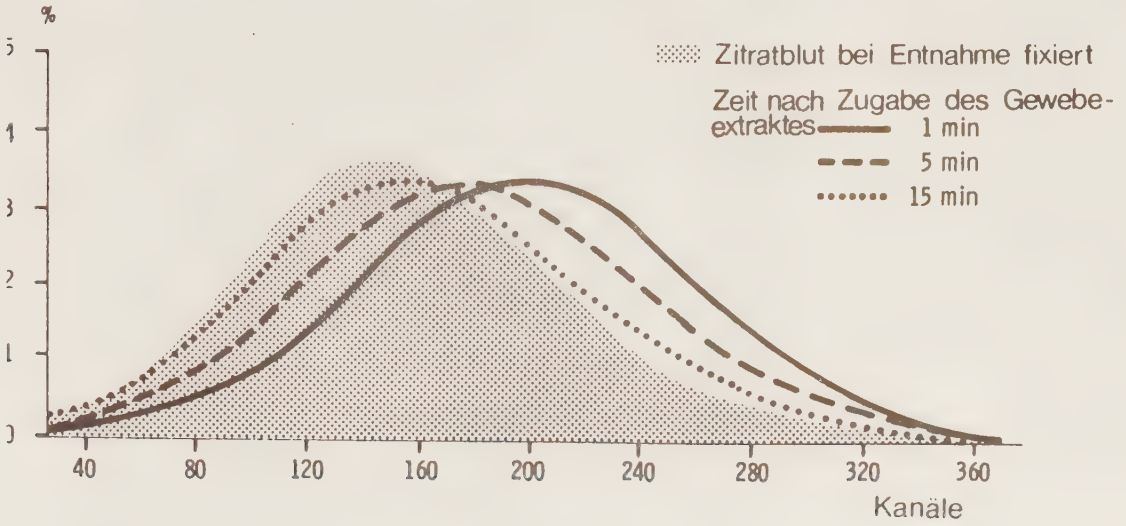
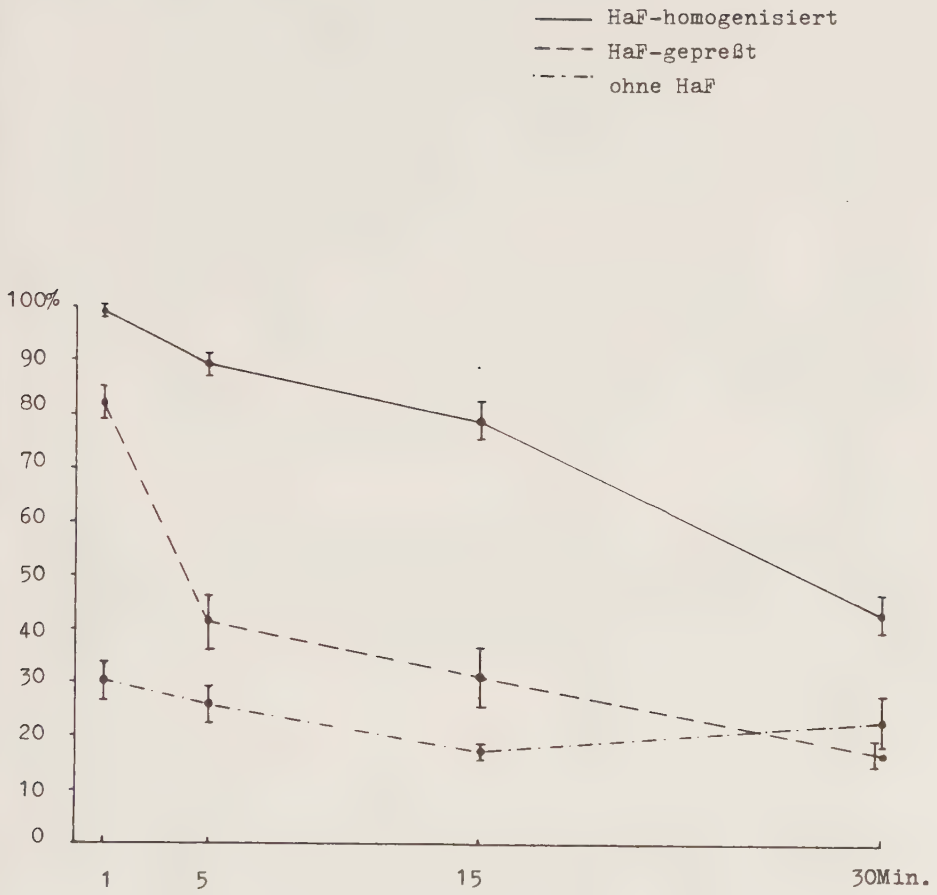
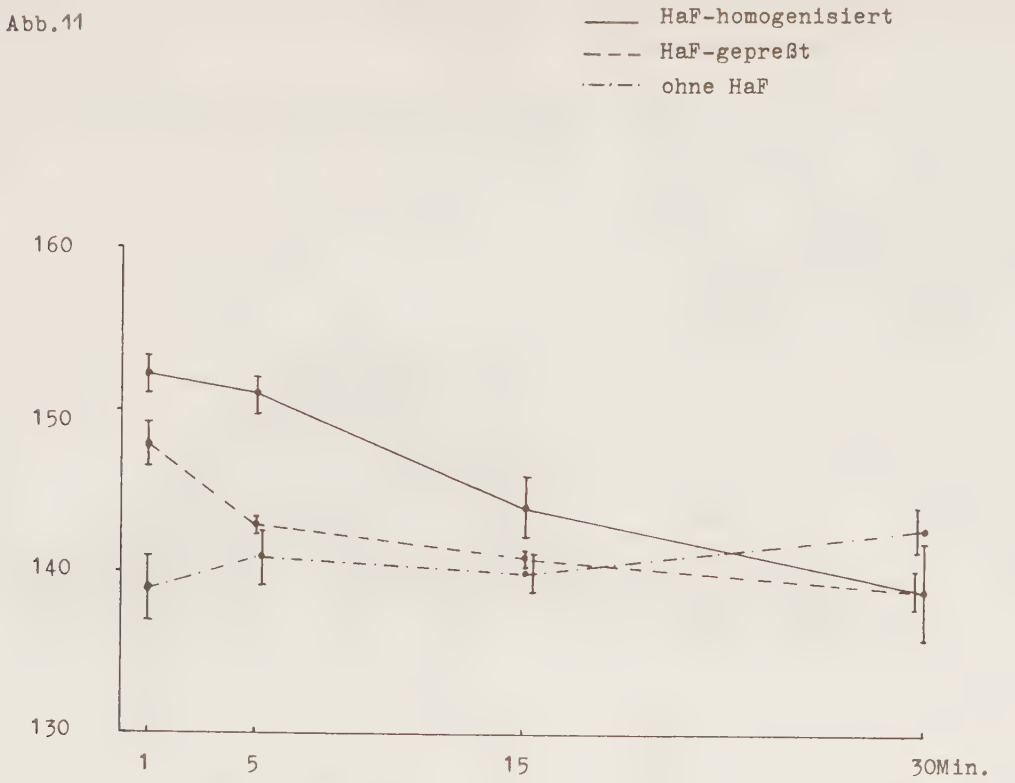


Abb.10



Verlauf des Anteils der Formveränderten Thrombozyten in den Zeiträumen 1Min.,5Min.,15Min.u.30Min. nach Blutentnahme unter Einwirkung von HaF und ohne HaF.

Abb.11



Verlauf der Median-Werte,der Volumenverteilung,des Thrombozytenformwandels, mit HaF(homogenisiert u.gepreßt) und ohne HaF-Einwirkung in den Zeitabständen 1Min.,5Min.,15Min.u.30Min. nach Blutentnahme.

3.2) Aktivitätsprüfung des Gewebsextraktes nach Apyrase - Einwirkung.

Nach 4stündiger Inkubation des Extraktes mit Apyrase bei 30°C wurden beim 1Min.Wert 18,4%,beim 5Min.Wert 12,6%,beim 15Min.Wert 10,4% und beim 30Min.Wert 9,0% formveränderte Thrombozyten ermittelt. Diese Werte liegen knapp unter den Leerwerten.
Die Median-Werte des mit Apyrase behandelten HaF's liegen deutlich unterhalb des Leerwertes, 1Min.-11%,5Min.-12,6%,15Min.-8,8% und 30Min.-12,2%. Siehe Anhang und Abb.12-15. Eine in Abb.12 gezeigte ausgeprägte linke Schulter könnte aus,durch Apyrase, zerstörten Zellen bestehen.

Abb.12

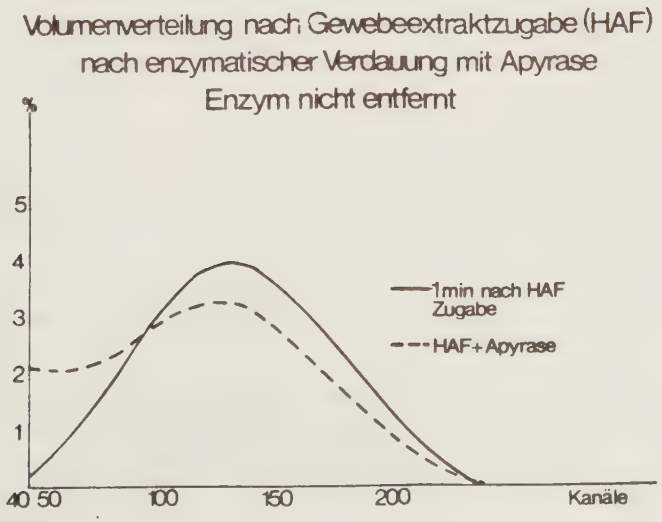
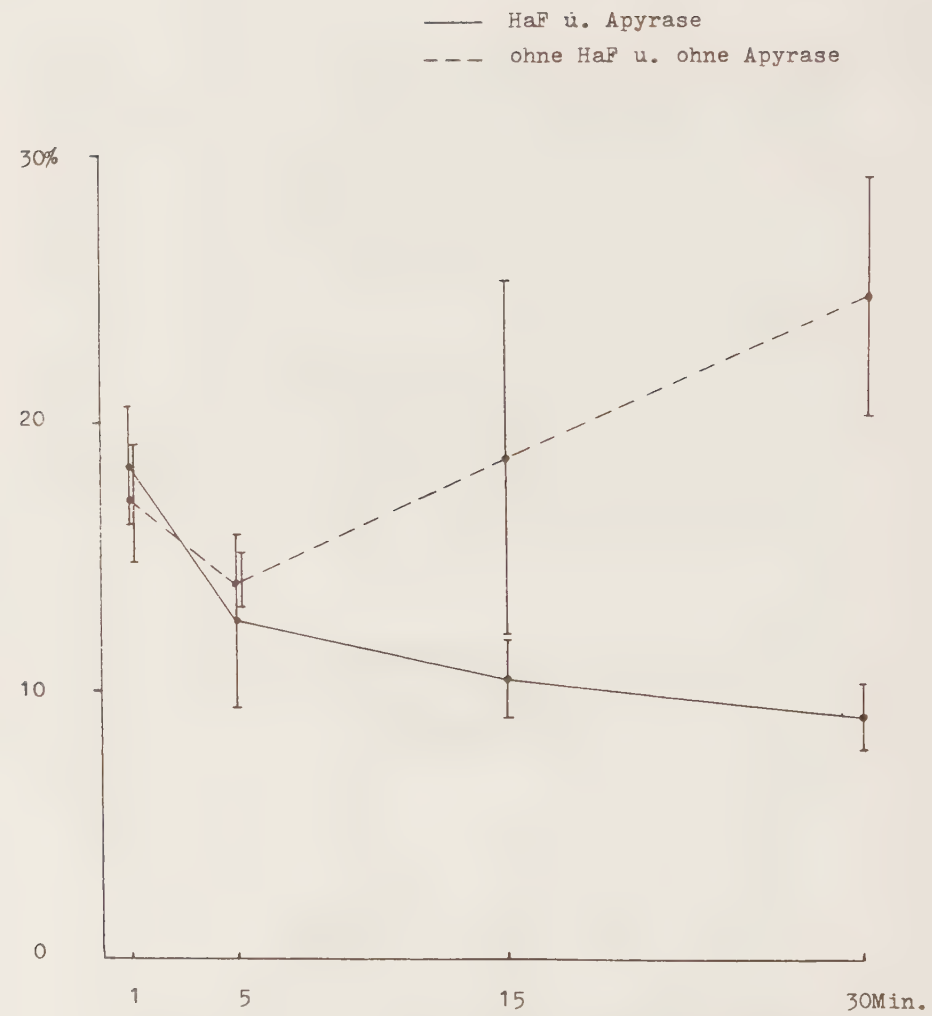
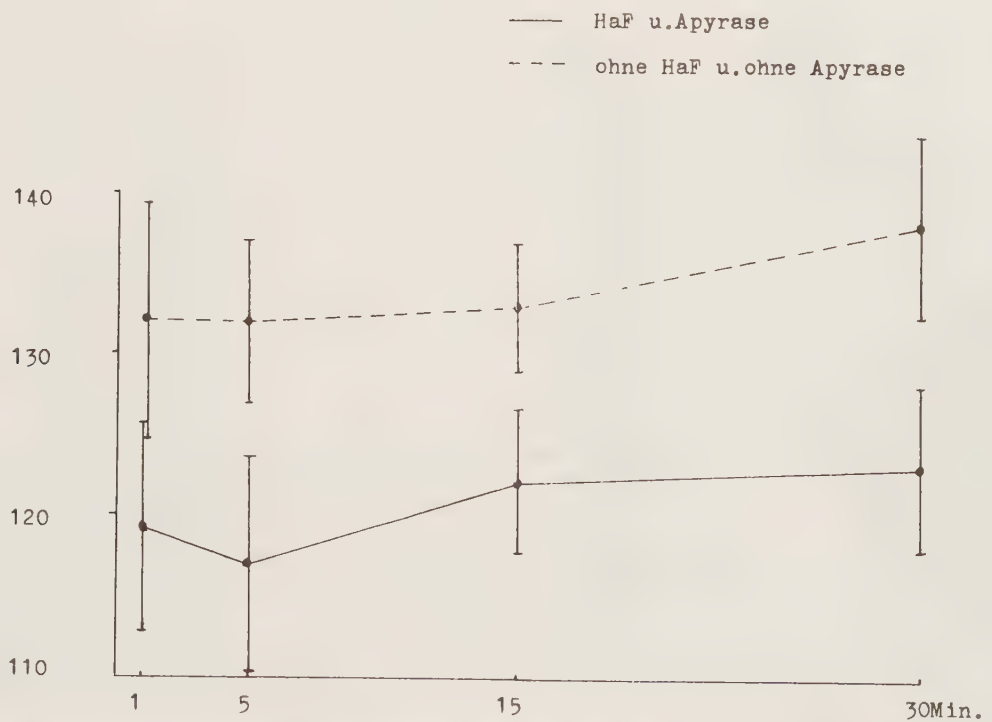


Abb.13



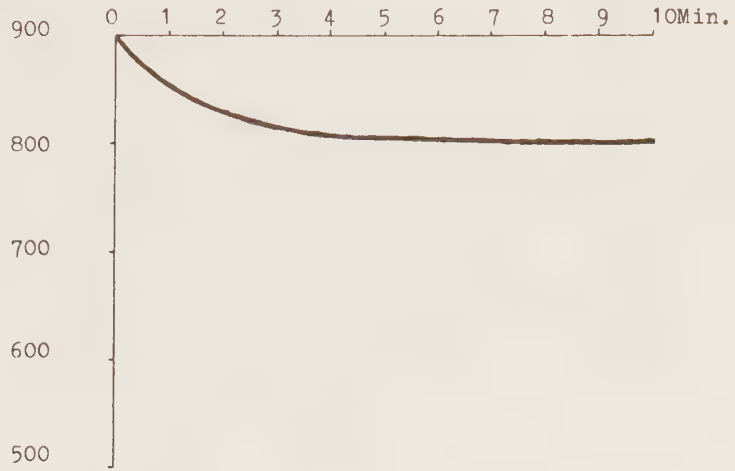
Verlauf des Anteils der formveränderten Thrombozyten in den Zeiträumen 1Min.,5Min.,15Min.u.30Min.nach Blutentnahme unter Einwirkung von HaF u.Apyrase und ohne HaF u. ohne Apyrase..

Abb.14



Verlauf der Median-Werte der Volumenverteilung,des Thrombozytenformwandels mit HaF u. Apyrase und ohne HaF u.ohne Apyrase-Einwirkung in den Zeitabständen 1Min.,5Min.,15Min. u.30Min.nach Blutentnahme.

Abb.15 ADP-induzierte Aggregation nach Apyrase-Einwirkung



3.3) Ultrafiltration des Extraktes nach 4stündiger Apyrase-Einwirkung.

Nach Ultrafiltration des Extraktes betrug der Unterschied zum Leerwert nur noch: 1 Min-2,2%, 5 Min.-1,8%,15 Min.-2,2%, 30 Min.-1,2%.
Die Median-Werte der Volumenverteilung weichen von den Leerwerten nur sehr gering ab: 1 Min.-1%, 5 Min.-1%, 15 Min.-0%, 30 Min.-5,1%. Siehe Anhang und Abb.16 - 19

Abb.16

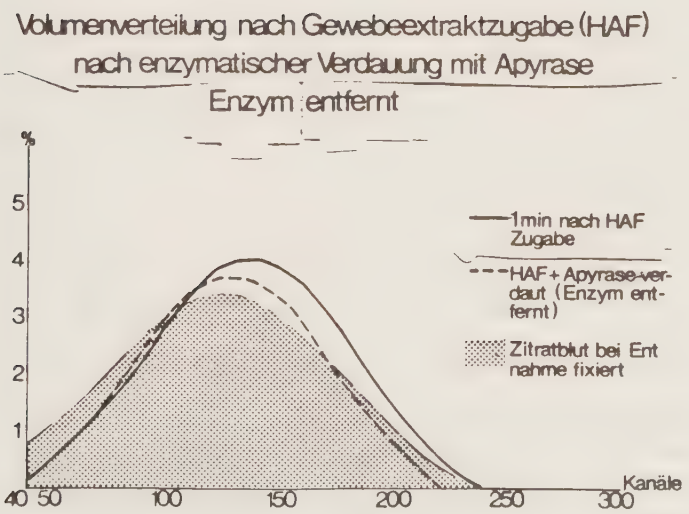
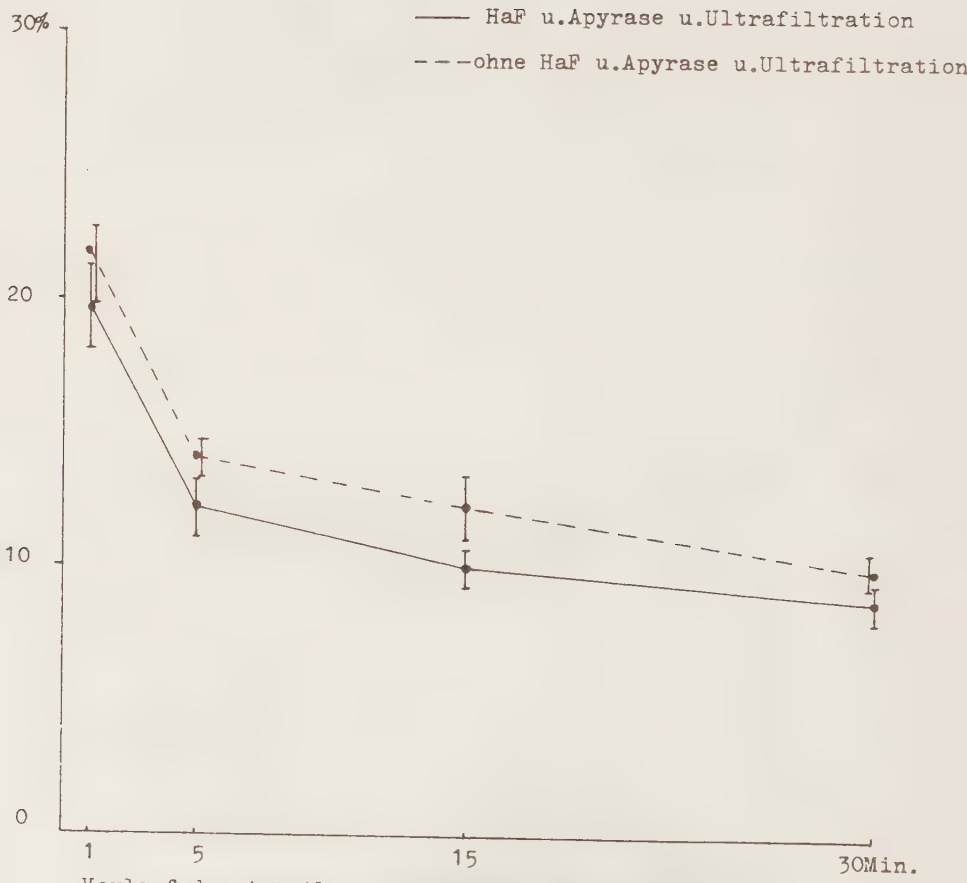
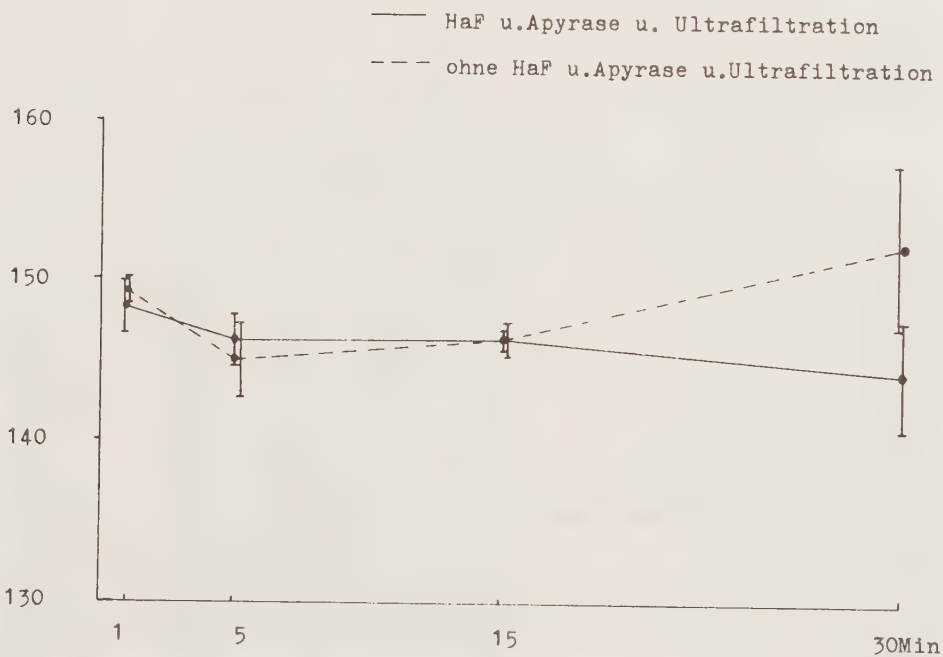


Abb.17



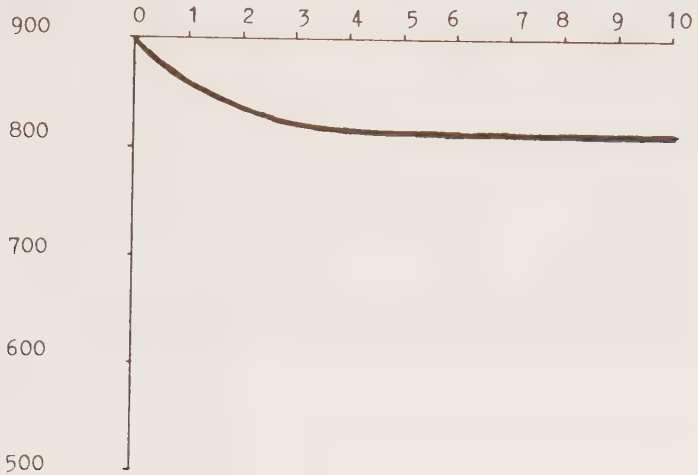
Verlauf des Anteils der formveränderten Thrombozyten in den Zeiträumen 1Min.,5Min.,15Min.u.30Min.nach Blutentnahme unter Einwirkung von HaF u.Apyrase u.Ultrafiltration im Vergleich zu den Leerwerten.

Abb. 18



Verlauf der Median-Werte der Volumenverteilung, des Thrombozytenformwandels mit HaF(homogenisiert) u. Apyrase u.Ultrafiltration und ohne Gewebsextraktzugabe, in den Zeitabständen 1Min., 5Min., 15Min. u. 30Min. nach Blutentnahme.

Abb.19 Kollagen-induzierte Aggregation nach Apyrase-Einwirkung u. Ultrafiltration



3.4) Retentionstest nach Hellem II, modifiziert nach Sayegh.

Die Zugabe von 0,3ml Gewebsextrakt zu 2,7ml Citratblut erhöhte die Retention von einem Ausgangswert von Ø 1,6% auf Ø 11,87% Retention. Nachdem der Extrakt einer 4stündigen Inkubation durch Apyrase ausgesetzt war ging der Wert auf Ø 4,31% Retention zurück.
Die anschließende Ultrafiltration des Extrakt-Apyrase-Gemisches ließ die Retention auf den Ø-Wert von 1,92% sinken. Dieser Wert ist wiederrum fast identisch mit dem Ausgangswert von Ø 1,60% Retention. Siehe Anhang und Abb.20

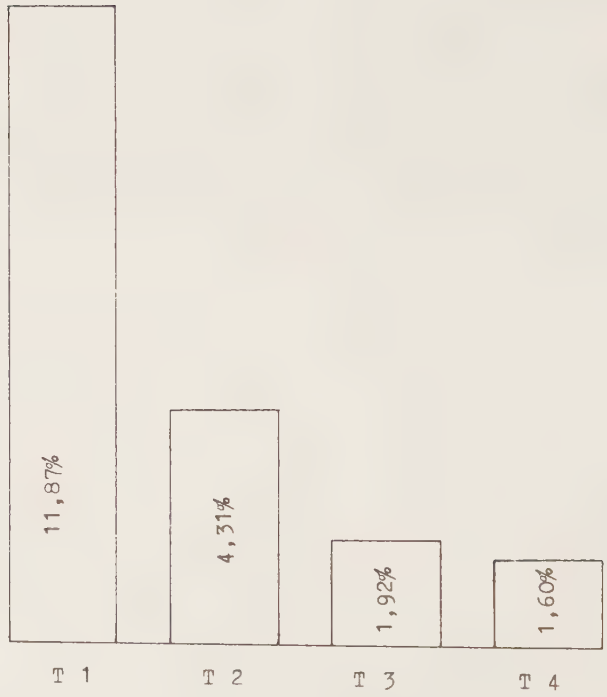
Abb.20

T 1 - HaF

T 2 - HaF,Apyrase

T 3 - HaF,Apyrase,Ultrafiltration

T 4 - ohne Gewebsextrakt Zugabe



Darstellung des Thrombozytenretentionstest nach Hellem II, mit HaF, HaF u.Apyrase,HaF u.Apyrase u.Ultrafiltration und ohne Gewebsextrakt Zugabe

3.3) ATP-und ADPinduzierter Thrombozytenform wandel in den Konzentrationen 10^{-6},10^{-7},10^{-8}.

Der Unterschied zwischen ATP-und ADPinduziertem Thrombozytenformwandel ist in der Konzentration 10^{-6} gering,zugunsten von ADP.
1 Min.-1,2%,5 Min.-2,6%,15 Min.-1,2% und 30 Min.-0,4%.
Der größte Unterschied besteht in der Konzentration von 10^{-7}.
1 Min.-42%,5 Min.-43,6%,15 Min.-22% und 30 Min.-14%.
In der Konzentration 10^{-8}sinkt er wieder etwas ab.
1 Min.-21,6%,5 Min.-16,4%,15 Min.-9,4% und 30 Min.-3,6%.

Die Median-Werte der Volumenverteilung differieren in der Konzentration 10^{-7} zwischen ATP und ADP um durchschnittlich 0,6%,.in der Konzentration 10^{-7} liegen die Werte bei ADP um, 1 Min.-6,5%,5 Min.-3,6%, 15 Min.-2,5% und 30 Min.-1,3% höher als bei ATP.
In der Konzentration von 10^{-8}sinkt die Differenz auf einen Durchschnitt von 1,6%.Siehe Anhang und Abb.21-25

Abb.21

Volumenverteilung durch Zugabe von ADP und ATP 10^{-7}M

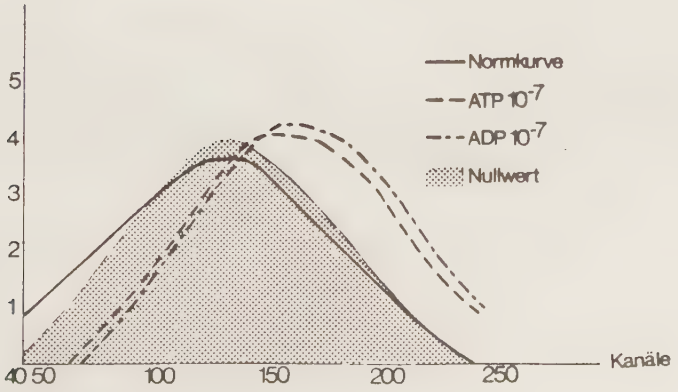
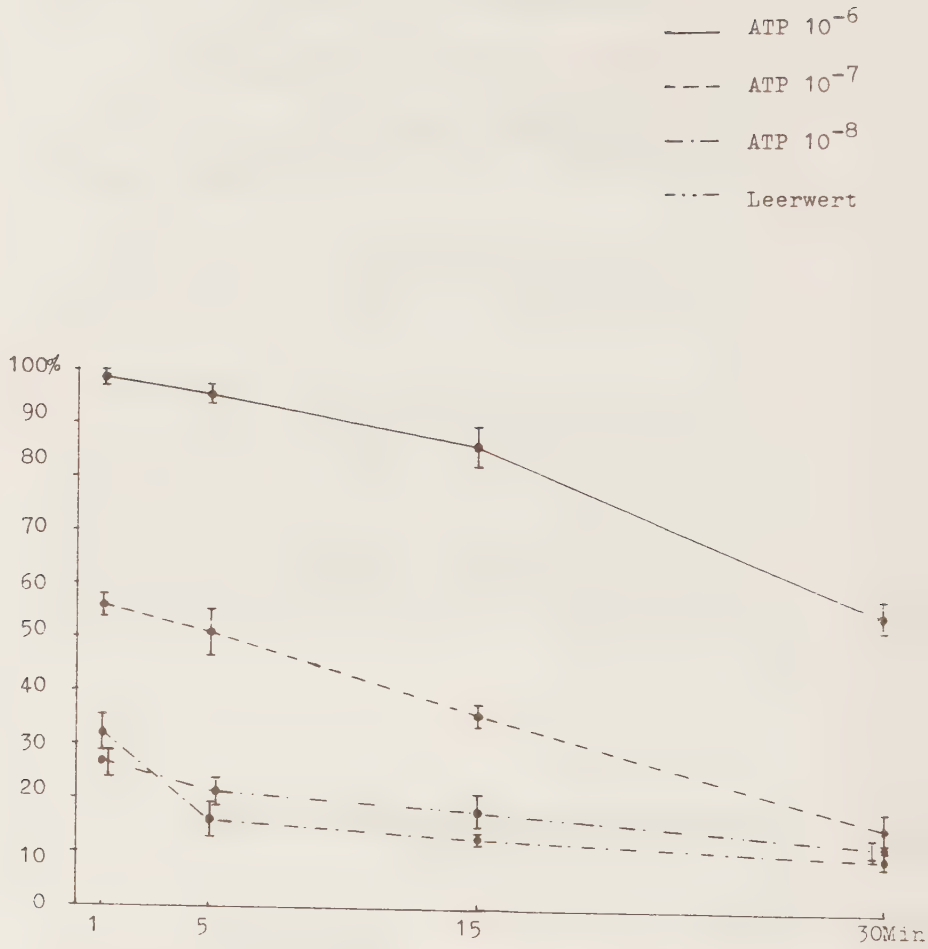
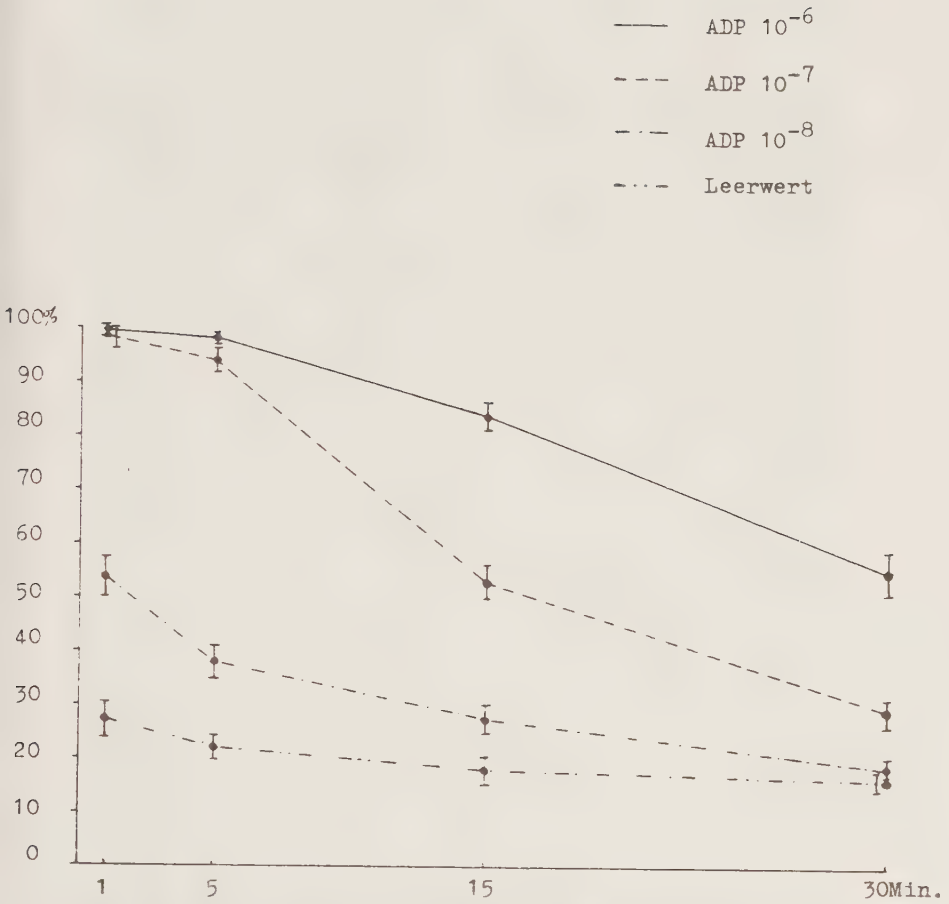


Abb.22



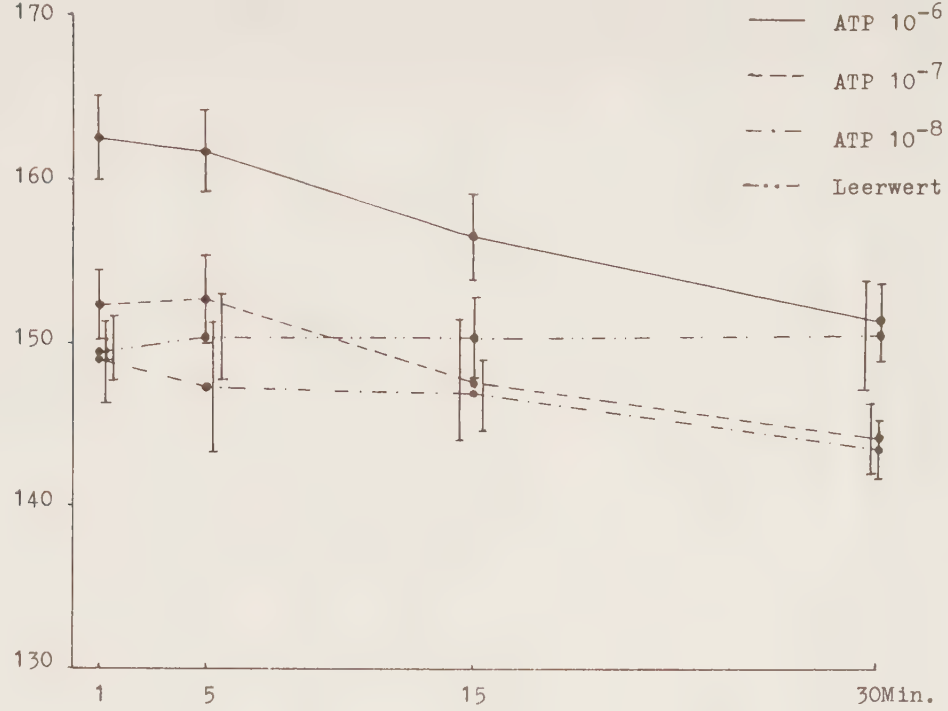
Verlauf des Anteils der Formveränderten Thrombozyten in den Zeiträumen 1Min.,5Min.,15Min.u.30Min.nach Blutentnahme unter Einwirkung von ATP 10^{-6},10^{-7}u.10^{-8}und ohne ATP.

Abb.23



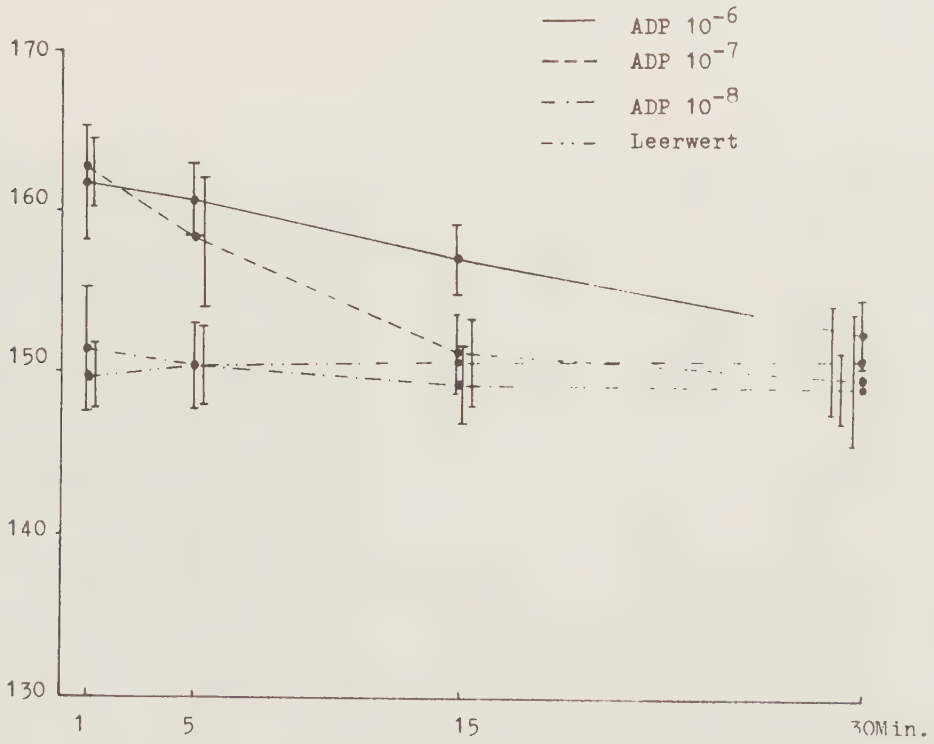
Verlauf des Anteils der formveränderten Thrombozyten in den Zeiträumen 1Min.,5Min.,15Min.u.30Min.nach Blutentnahme unter Einwirkung von ADP 10^{-6},10^{-7},10^{-8}u. ohne ADP.

Abb. 24



Verlauf der Median-Werte,der Volumenverteilung, des ATP-induziertem Thrombozyten-formwandels,in den Zeitabständen 1Min.,5Min.,15Min.u.30Min. nach Blutentnahme.

Abb.25



Verlauf der Median-Werte,der Volumenverteilung,des ADP-induziertem Thrombozyten-formwandel,in den Zeitabständen 1Min.,5Min.,15Min.u.30Min.nach Blutentnahme.

4) D I S K U S S I O N

Die Erkenntnis, daß menschliche Thrombozyten außerhalb des Organismus ihre Gestalt verändern, ist seit über 100 Jahren bekannt. (Osler 1874, Bizzozero 1881)
White (1971) machte darauf aufmerksam, daß unter dem Begriff der Formveränderung (shape change) verschiedene Vorgänge subsumiert werden, nämlich einmal die reversible Ausbildung kleiner Fortsätze der Thrombozyten bei unspezifischer Irritation und zum anderen die Entwicklung langer Pseudopodien als Anzeichen starker Aktivierung der Plättchen unmittelbar vor der Aggregation nach Einwirkung von aggregationsauslösenden Substanzen.

Untersuchungen durch Born (1962) ergaben, daß der Formwandel und die Schwellung der Plättchen nach bestimmten Induktoren mit einer gesteigerten Verfügbarkeit des Plättchenfaktors 3 einhergeht.
Der Autor deutet die Formveränderung als eine Zunahme der Entropie nachdem er durch die Feststellung eines Temperaturgradienten von 4,6 für den Formwandel zwischen 27 und 37°C zu dem Schluß gekommen war, daß die ursprüngliche Diskoidform der Thrombozyten ein thermodynamisch, instabiler Zustand sei, der durch dauernde Energiezufuhr aufrecht erhalten werden müsse.

Der instabile Zustand durch geringste Anomalitäten im Milieu oder im Stoffwechsel der Plättchen habe die Formveränderung zur Folge.
Als auslösendes Moment der Formveränderung nimmt Born (1972) eine Verschiebung des ATP/ADP Quotienten in der Plättchenmembran zugunsten von ADP an, die z.B. durch äußere ADP-Zufuhr, durch Hemmung des ATP-Aufbaues oder durch gesteigerten ATP-Verbrauch bewirkt werden kann.

Bei dem Versuch, Formwandeluntersuchungen für klinische Zwecke zu standardisieren, beobachteten Bender und Kirchmaier (1979), daß die Plättchen in etwa 10% der unmittelbar bei Blutentnahme fixierten Proben bis zu 90% vormverändert waren. Dies veranlaßte zu gezielten Fehlpunktionen und Aspirationen von Gewebssaft mit anschließender Blutentnahme durch die gleiche Kanüle, dabei betrug die Stimulationsrate im Mittel 64,5% gegenüber 20-25% bei exacter Blutentnahme.
Dieser Versuch zeigte, daß es offenbar möglich ist, durch Beimengen von Gewebssaft einen Formwandel der Thrombozyten innerhalb von Bruchteilen von Sekunden zu erzielen.
Im Gegensatz dazu läuft der Formwandel ohne Gewebssaft beizumengen verhältnismäßig langsam ab. Nach Breddin (1976) liegen nach 30 Minuten etwa 40% der Plättchen formverändert vor.

Ausgehend von diesen Beobachtungen stellten sie Gewebsextrakt zunächst aus frischem intraoperativ gewonnenem menschlichem Fettgewebe her, später auch aus Fettgewebe verschiedener Tierspezies. Dabei erwies sich eine Fraktion aus dem omentum maius des Hausschweines als besonders geeignet und hochaktiv.

Das Herstellungsverfahren wurde von Bender und Kirchmaier (1979) standardisiert, die so gewonnene Substanz wird im folgenden als hämostaseaktiviernder Faktor (HaF) bezeichnet.
HaF führt in kleinen Mengen, unmittelbar nach der Blutentnahme zugesetzt, zu einem maximalen Plättchenformwandel. In Blutproben, die bei 37°C inkubiert werden, bildet sich innerhalb der folgenden 30 Minuten der gesteigerte Formwandel teilweise wieder zurück.

Apyrase ist ein Enzym das für die starke katalytische Wirkung eines Kartoffelextraktes auf die hydrolytische Spaltung von ATP (Kalckar 1944) verantwortlich gemacht wird (Meyerhof 1945).
Rozenberg und Holmsen (1968) nehmen an, daß im wsentlichen ADP in AMP umgesetzt wird.
Solum (1970) beobachtete, daß Apyrase die Aggregation der Plättchen, die nach Zugabe von Fibrinogen zu gewaschenen Thrombozyten beobachtet wurde, vollkommen verhindert. Wenn er gewaschenen Plättchen Fibrinogen und ADP zusetzte, kam es nach Apyrase-Einwirkung zu einer Desaggregation, die ohne Apyrase nicht auftrat. Apyrase verhinderte also eine irreversible Aggregation der gewaschenen Thrombozyten.
Hirsch und Mustard (1973) beobachteten eine leichte Reduktion der extrazellulären Anhäufung von Adenin-Nucleotiden in Gegenwart von Albumin und Apyrase, aufgrund dieser Befunde nehmen sie an, daß der Effekt der Apyrase auf der ADP-ase Aktivität beruht.
Funktionell wurde in diesen Untersuchungen die ADP-induzierte Aggregation bis zu 5 Stunden vollwertig erhalten wenn Apyrase und Albumin im Suspensionsmedium waren.

Da sich unter der Einwirkung von Apyrase noch ATP-Bestände in den Plättchen nachweisen lassen, ist es unwahrscheinlich, daß Apyrase als Stoffwechsel-Hemmer wirkt.
Apyrase und Albumin erhalten die funktionelle Kapazität und die ultrstrukturelle Integrität der Plättchen. Dabei deutet die weitere Feststellung, daß Apyrase den Verlust von Thrombozyten-LDH und ß-Glucuronidase während der Inkubation nicht in statistisch signifikanter Weise beeinflußt, allerdings daraufhin, daß es der Plättchenmembran wenig Schutz bietet.
Rifkin, Friedberg und Zucker (1973) fanden bei Untersuchungen bei gesunden Patienten und Patienten mit künstlichen Herzklappen oder von-Willebrand's disease, daß die Plättchenretention im gestörten Blut niedrig war, und daß sie nach Inkubation des Blutes mit Apyrase normalisiert wurde.
Folgt man der Erklärung der Apyrase-Wirkung als einer Senkung der Konzentration von Adenin-Nucleotiden im Milieu der Plättchen (Ardlie 1971), dann wird die Reduzierung des Anteils der formveränderten Thrombozyten als Verhinderung einer Verschiebung des ATP/ADP-Quotienten in der Plättchenmembran, die als Auslöser der Formveränderung genannt worden ist (Born 1972).
Bei dieser Vorstellung würde die Apyrase jedes ATP und ADP, das aus den Plättchen freigesetzt oder von außen zugesetzt wird, spalten, das in der Zellmembran lokalisierte ATP aber nicht angreifen, bzw. zumindest nicht stärker angreifen als das dort lokalisierte ADP.

Unter der so erklärten Schutzwirkung der Apyrase gegenüber der Auslösung einer Formveränderung durch einen äußerlichen Vorgang, der nichts mit dem Stoffwechsel der Plättchen zu tun hat, kann auch der Erhalt der Plättchenfunktion unter physikalischen und chemischen Belastungen,sowie während eines längeren Zeitraumes nach Blutentnahme begriffen werden (Ardlie 1971, Mustard 1972, Levy-Toledano 1973, Doery 1973).
Hinsichtlich der Wirkung von ADP auf den Thrombozytenstoffwechsel liegen widersprüchliche Befunde vor: Corn (1966) beschrieb, daß die ADP-induzierte Aggregation ohne einen Anstieg der Lactat-Produktion einhergehe.
Andere Untersucher fanden einen schnellen Lactat-Anstieg unter ADP-Wirkung, der sich wieder normalisierte (Holmsen 1969). O'Brien (1967) beschrieb die ADP-induzierte Aggregation als einen energieverbrauchenden Prozeß, der seine Energiezufuhr aus dem aeroben oder anaeroben Abbau von Glukose erhalte. Gross (1967) nannte als Energiequelle für die Plättchenfunktion die Adenin-Nucleotiden. Daß die ADP-induzierte Aggregation nur bei Funktion eines energieliefernden Stoffwechsels der Thrombozyten stattfindet, bestätigt auch (Hellem 1967). Unter Einwirkung von Stoffwechselhemmern beschrieb (Kattlove 1973) einen Abfall des Thrombozytengehaltes an ATP und ein Nachlassen der ADP-induzierten Aggregation.
Allerdings verursachte ADP nur dann einen ATP-Abfall, wenn der Stoffwechsel gehemmt war.

Er folgerte daraus, daß für die ADP-induzierte Aggregation ATP gebraucht wird, das vom Plättchenstoffwechsel nachgeliefert wird.
Diese Befunde decken sich im Endeffekt mit den Ergebnissen von (Skalhegg 1964). Der letztgenannte Autor entwickelte auch ein theoretisches Modell für die Wirkungsweise des ADP an der Plättchenoberfläche. Ein Molekül ADP wird über eine Brücke, für deren Ausbildung Calcium und von-Willebrand Faktor erforderlich sind, an freie Sulfhydrylgruppen von Proteinen in der Plättchenmembran gebunden. Drei freie negative Valenzen an dem Diphosphat-Anteil des ADP sind dann die eigentlichen appositions-und aggregationsvermittelnden Stellen, zwei der drei Valenzen werden durch ein Calcium-Ion besetzt, an die dritte Stelle lagert sich ein weiteres Calcium-Ion an, das andererseits mit seiner zweiten Valenz die Verbindung zu einem ADP-Molekül an einem anderen Plättchen herstellt (Skalhegg 1964).

Bei der Suche nach den Ursachen der Blutgerinnung, spielt der Thrombozytenformwandel wahrscheinlich eine bedeutende Rolle und in diesem Zusammenhang natürlich die Thrombozytenaggregation und die Thrombozytenretention.

In den folgenden Versuchen wurde als erstes die Aktivität des auf zwei verschiedenen Methodikwegen hergestellten Gewebsextraktes getestet.

1) HaF-homogenisiert
2) HaF-gepreßt

Beim qualitativen Vergleich war eindeutig zu erkennen, daß HaF-homogenisiert, wie es auch routinemäßig hergestellt wird, die höhere Aktivität gegenüber HaF-gepreßt besitzt. Was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß bei HaF-homogenisiert mittels kleiner Messerchen die Zellen zerschnitten wurden und dadurch aus den Zellen mehr Adenin-Nucleodite und andere Stoffe, die, die Formveränderung auslösen freigesetzt wurden, als bei HaF-gepreßt wo die Zellen wahrscheinlich zum Teil nur deformiert wurden und somit ihre hämostase-aktivierenden Stoffe nicht freigesetzt werden konnten. In den weiteren Versuchen wurde dann ausschließlich HaF-homogenisiert verwendet.

Nachdem HaF 4 Stunden der Wirkung von Apyrase ausgesetzt wurde, fand sich in dem anschließend ausgeführten Formwandel nur noch ein geringer prozentualer Anteil formveränderter Thtombozyten.
Es ist deshalb anzunehmen, daß Apyrase die im HaF befindlichen Adenin-Nucleoditen welche für die erhöhte Anzahl formveränderter Thrombozyten in vitro mit verantwortlich sind, also ATP und ADP zu AMP spaltet, sodaß keine Verschiebung des ATP/ADP-Quotienten stattfinden kann.
Aufgrund der in der Volumenverteilungskurve erkennbaren linken Schulter, welche aus Zelltrümmern bestehen könnte, ist anzunehmen, daß Apyrase nicht nur im Milieu und an der Oberfläche sondern an der Plättchenmembran wirkt.

Denn nach dem in einem anschließenden Versuch Apyrase, vor dem durchgeführten Formwandel, aus dem HaF-Apyrase-Gemisch herausgefiltert wurde war diese linke Schulter nicht mehr vorhanden.
Dies wiederum würde der von Doery, Hirsch und Mustard (1973) beschriebenen protektiven Wirkung, wobei Apyrase nach den Autoren lediglich ATP und ADP im Milieu und an der Oberfläche der Plättchen spaltet, der Apyrase auf den Plättchenstoffwechsel widersprechen.

In einem Thrombozytenretentionstest nach Hellem II, modifiziert nach Sayegh konnten die Ergebnisse der vorherigen Versuche bestätigt werden.
Die Anzahl der retinierten Thrombozyten war nach HaF-Inkubation bedeutend höher als bei Nativblut. Senkte sich jedoch nach Apyrasezugabe um über die Hälfte und war nach Ultrafiltration der Apyrase und wahrscheinlich auch anderer Stoffe die den Formwandel auslösen können, wieder fast identisch mit dem Wert bei Nativblut.
Die niedrigen Prozentzahlen (Retentionswert) gegenüber denen von Sayegh (1974) ist erstens auf die geringere Schlauchlänge und zweitens auf den geringeren Innendurchmesser zurückzuführen.

Trotzdem wurde auch hier die katalytische Wirkung der Apyrase auf die hydrolytische Spaltung von ATP und ADP bestätigt, also eine Umwandlung von ATP und ADP in AMP und die damit verbundene reduzierte Anzahl der formveränderten Thrombozyten, was wiederum einen niedrigeren Retentionswert zufolge hat.

Ein abschließend durchgeführter ATP- und ADP-induzierter Thrombozytenformwandel ergab, daß der mit ADP durchgeführte Formwandel in allen drei verwanden Konzentrationen, am stärksten bei der Konzentration 10^{-7}, einen höheren Anteil formveränderter Plättchen aufweist als bei ATP. Dies wiederum geht konform mit Born (1972) der als auslösendes Moment der Formveränderung eine Verschiebung des ATP/ADP-Quotienten in der Plättchenmembran zugunsten von ADP annimmt.

5) Z U S A M M E N F A S S U N G

Als erstes wurde in dieser Arbeit ein Extrakt aus subcutanem Fettgewebe (Schwein), der den Hämostase aktivierenden Faktor (HaF) enthält, auf zwei verschiedenen Wegen hergestellt, um den Extrakt mit der höheren Aktivität für die restlichen Versuche zu verwenden.

Der Extrakt, der mittels eines Homogenisators hergestellt wurde, enthielt die höheren Aktivitäten gegenüber dem mittels Knoblauchpresse hergestellten Extrakt.

Nach 4stündiger enzymatischer Verdauung des Gewebeextraktes mit Apyrase, war dessen formwandelstimulierende Wirkung neutralisiert, die prozentuale Anzahl formveränderter Thrombozyten lag sogar unter dem des Leerwertes.

Erst nach Ultrafiltration des Enzyms war der prozentuale Anteil der veränderten Thrombozyten wieder fast mit dem des Leerwertes identisch.

Zwei zur Kontrolle mit ADP- und Kollagen induzierte Aggregationen sind nach Apyrase-Einwirkung gehemmt.

Beim Retentionstest wird der Wert der formveränderten Plättchen zwar auch stark gesenkt, bleibt aber immer noch über dem des Leerwertes.

Erst nach Ultrafiltration des Enzyms kommt der Wert in die Nähe des Leerwertes.

ATP- und ADP induzierter Thrombozyten Formwandel wies eindeutig ADP und zwar in der Konzentration 10^{-7} als dominanteren Partner gegenüber ATP aus.

6) LITERATURVERZEICHNIS

ARDLIE N.G. ,PERRY D.W.,PACKHAM M.A.,MUSTARD J.F.
Influence of Apyrase on Stability of Suspensions of Washed Rabbit Platelets (35419)
Proc.Soc.exp.Biol.and Med. 1971,136,p.1021

BIZZOZERO G.
Über einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und Blutgerinnung
Arch.Path.Anat.Physiol. 1881,90,p.261

BORN G.V.R.
Aggregation of Blood Platelets by Adenosine Diphosphate and its Reversal
Nature 1962,Nr.4832,p.927

BORN G.V.R.
The functional Physiology of Blood Platelets
Adv.in exp.Biol.and Med. 1972,34

BREDDIN K.,WIEDEMANN R.,ZIEMEN M.,GRUN H., BAUER O.,HERMANN W..
Formwandel und Funktionsverhalten der Thrombozyten nach der Blutentnahme
In: GASTPAR H.:Onkohaemostaseologie,Verh.DAB 1975 SCHATTAUER F.K.,Stuttgart-New York,1976,p.297-304

CORN M.
Effect of Thrombin,Adenosine Diphosphate, Connective Tissue and Endotoxin on Platelet Glycolisis
Nature,1966,Vol.212,p.508

DOERY J.C.G.,HIRSH J.,MUSTARD J.F.
Energy Metabolism in Washed Human Platelets Responsive to ADP:Comparison with Platelets in Plasma
HIEG,1973,73-26

GROSS R.
Platelet Enzymes
TDH 1967,26,p.143

HELLEM A.J.
The Role of Platelet Metabolism in Adenosine Diphosphate-Induced Platelet Adhesiveness
TDH 1967,26p.193

HOLMSEN H.,DAY J.H.,STORMORKEN H.
The Blood Platelet Release Reaction
Scand.Journal of Haematology,
Suppl.No.8,Copenhagen 1969

KALCKAR H.M.
Adenylpyrophosphatase and Myokinase
Journal of biol.chem. 1944,153,p.355

KATTLOVE H.E.
The Role of Platelet ATP in Adenosine Diphosphate-Induced Aggregation
HIEG 1973,73-19

KIRCHMAIER C.,BENDER N.,WILHELM B.
SAYEGH A.AL , BREDDIN K.
A hemostasis activatingfactor (HAF) in subcutaneous tissue extracts:Effects on morphologic platelet changes,platelet retention and platelet aggregation
Thrombos.Res.1979,16,p.81-91

LEVY-TOLEDANO S.,RENDU F.,BODEVIN E.,CAEN J.P.
Apyrase,albumin,Gamma-Globulins and Fibrinogen Requirement for Human Gel-Filtered Platelet Aggregation
ETL p.303

MEYERHOF O.
The Origin of the Reaction of Harden and Young in cellfree Alcoholic Fermentation
Journal of biol.chem.1945,157,p.105

MUSTARD J.F.,PERRY D.W.,ARDLIE N.G.,PACKHAM M.A.
Preparation of Suspensions of Washed Platelets from Humans
BJH 1972,22,p.193

O'BRIEN J.R.,HEYWOOD J.B.
Some interactions between human platelets and glass:vonWillebrand's diseas comparde with normal
Journal of clin.Path. 1967,20,p.56

OSLER W.
An account of certain organisms occuring in the liquor sanguinis
Proc.Royal Academie 1874,22,p.391

RIFKIN P.L.,FRIEDBERG N.M.,ZUCKER M.B.
The Effect of Apyrase on Platelet Retention in Normal Subjects and in Patients with abnormal Cardiac Valves or with von Willebrand's Diseas
TDH 1973,30,p.215

ROZENBERG M.C.,HOLMSEN H.
Adonine Nucleotide Metabolism of Blood Platelets. IV. Platelet Aggregation Response to Exogenous ATP and ADP
Biochimica et Biophysica Acta 1968,157,p.280

SKAREBO B.A.,HELLEM A.J.,ØDEGAARD A.E.
Investigations on Adenosine Diphosphate (ADP Induced) Platelet Adhesiveness in Vitro
Part II Studies on the Mechanism
TDH 1964,11,p.305

SOLUM N.O.
ADP-Induced Aggregation of Washed Platelets
Scand.J. of Haematology 1970,7,p.236

WHITE J.G.
Platelet Morphology
in the circulating platelet,ed by Johnson S.A.
New York,Academic Press 1971,p.45

7) A N H A N G

Tab.1

Ha^{++}-induzierter Thrombozytenformwandel (homogeniiert) Wert in Prozent.

	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	100	92	79	48
S 2	98	90	85	45
S 3	100	89	80	40
S 4	100	90	74	43
S 5	100	88	78	40
$\bar{X}$	99,6	89,8	79,2	43,2
S	0,89	1,48	3,96	3,42

Tab.2

HaF-induzierter Thrombozytenformwandel (gepreßt)
Wert in Prozent.

	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	81	48	40	14
S 2	83	44	33	19
S 3	78	40	30	15
S 4	83	38	25	20
S 5	85	35	28	18
$\bar{X}$	82,0	41,0	31,2	17,2
S	2,65	5,10	5,72	2,59

Tab.3

Thrombozytenformwandel ohne HaF
Wert in Prozent.

	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	29	31	20	21
S 2	32	28	17	32
S 3	30	24	17	23
S 4	26	22	16	20
S 5	35	25	18	20
$\bar{X}$	30,4	26,0	17,6	23,2
S	3,36	3,54	1,52	5,07

Tab.4

Median-Wert der Volumenverteilung bei HaF-(homogenisier induziertem Thrombozytenformwandel.

	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	153,89	148,50	143,25	140,95
S 2	151,16	151,90	148,20	135,02
S 3	153,17	151,74	147,99	141,76
S 4	153,44	150,26	145,53	139,49
S 5	153,17	152,65	147,60	140,97
$\bar{X}$	152,96	151,01	146,53	139,64
S	1,05	1,65	2,12	2,71

Tab.5

Median-Wert der Volumenverteilung bei HaF-(gepreßt) induziertem Thrombozytenformwandel.

	1 Min.	5 Min..	15 Min.	30 Min.
S 1	149,14	143,91	140,72	139,44
S 2	147,94	144,09	141,17	138,54
S 3	147,69	142,29	141,94	139,30
S 4	148,20	143,09	141,96	139,26
S 5	151,23	144,14	141,54	141,40
$\bar{X}$	148,84	143,50	141,47	139,59
S	1,44	0,80	0,53	1,07

Tab.6

Median-Wer der Volumenverteilung bei Thrombozytenformwandel ohne HaF.

	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	141,05	142,61	141,70	139,42
S 2	136,17	141,46	141,56	139,95
S 3	139,26	138,30	138,88	142,83
S 4	139,17	141,46	141,52	143,22
S 5	142,37	141,57	141,42	140,28
$\bar{X}$	139,60	141,08	140,80	141,14
S	2,34	1,63	1,13	1,75

Tab. 7

HaF-(homogenisiert) induzierter Thrombozyten-formwandel nach Apyrase-Einwirkung(Wert in Prozent)

	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	20	14	10	10
S 2	18	13	11	9
S 3	15	7	8	10
S 4	18	13	12	7
S 5	21	16	11	9
$\bar{X}$	18,4	12,6	10,4	9,0
S	2,30	3,36	1,52	1,22

Tab. 8

Leerwert zu Tab. 7 .

	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	18	13	15	25
S 2	17	14	13	18
S 3	14	13	15	25
S 4	17	15	20	30
S 5	20	15	30	26
$\bar{X}$	17,2	14,0	18,6	24,8
S	2,17	1,0	6,88	4,32

Tab. 9

Median-Werte der Volumenverteilung des mit Haf-(homogenisiert) induziertem Thrombozyten-formwandel.

	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	109,26	109,73	121,06	114,33
S 2	126,58	125,12	130,02	126,41
S 3	119,82	112,21	120,47	126,95
S 4	121,99	123,38	122,85	122,91
S 5	118,99	116,78	119,37	125,21
$\bar{X}$	119,33	117,45	122,75	123,16
S	6,35	6,74	4,25	5,18

Tab. 10

Leerwert zu Tab. 9 .

	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	125,14	126,08	127,79	129,79
S 2	144,16	139,87	131,72	139,44
S 3	130,60	132,05	136,24	144,63
S 4	134,70	133,09	136,09	141,12
S 5	127,65	130,50	136,28	136,05
$\bar{X}$	132,45	132,32	133,62	138,21
S	7,45	5,00	3,79	5,63

Tab. 11

HaF-(homogenisiert)-Apyrase-Ultrafiltration-induzierter Thrombozytenformwandel(Wert in Prozent)

	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	20	12	10	9
S 2	19	11	11	8
S 3	20	13	9	10
S 4	22	14	10	8
S 5	17	11	10	9
$\bar{X}$	19,6	12,2	10,0	8,8
S	1,82	1,3	0.71	0,84

Tab. 12

Leerwert zu Tab. 11 .

	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	22	14	11	11
S 2	20	15	12	10
S 3	20	13	11	9
S 4	23	14	13	10
S 5	24	14	14	10
$\bar{X}$	21,8	14,0	12,2	10,0
S	1,79	0,71	1,30	0,71

Tab. 13

Median-Werte der Volumenverteilung bei HaF(homogenisiert)-Apyrase-Ultrafiltration-induziertem Thrombozytenformwandel.

	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	150,34	145,66	146,25	142,41
S 2	148,33	147,48	145,80	148,85
S 3	148,77	144,74	145,85	142,42
S 4	145,89	147,69	146,80	142,36
S 5	147,70	147,70	146,56	148,24
$\bar{X}$	148,21	146,65	146,25	144,86
S	1,62	1,37	0,44	3,38

Tab. 14

Leerwert zu Tab. 13

	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	146,48	144,73	145,17	159,27
S 2	147,65	143,86	147,06	150,82
S 3	146,77	141,88	145,24	146,62
S 4	145,58	147,03	147,51	155,75
S 5	146,97	147,48	146,66	148,98
$\bar{X}$	149,69	145,00	146,29	152,29
S	0,76	2,31	1,02	5,14

Tab. 15

Thrombozytenretentionstest nach Hellem II.

Test - 1 mit HaF(homogenisiert)

	0	1	Retention %
S 1	191250	145500	23,92
S 2	160500	151875	5,37
S 3	174750	162750	6,86
S 4	172500	169500	1,73
S 5	182250	147000	19,34
$\bar{X}$	176250	155325	11,87

Tab. 16

Test - 2 mit HaF(homogenisiert) und Apyrase

	0	1	Retention %
S 1	187500	172500	8,00
S 2	172500	173625	- 0,60
S 3	183000	173250	5,32
S 4	177000	174000	1,69
S 5	193500	180750	6,58
$\bar{X}$	182700	174825	4,31

Tab. 17

Test - 3 mit HaF(homogenisiert) ,Apyrase und Ultrafiltration.

	0	1	Retention %
S 1	159750	165000	-3,2
S 2	171000	161625	5,48
S 3	156000	165375	-6,00
S 4	173250	163125	5,84
S 5	180000	168750	6,25
$\bar{X}$	168000	164775	1,92

Tab. 18

Test - 4 Leerwert der Tab. 15-17

	0	1	Retention %
S 1	160500	160500	0,00
S 2	166500	165000	0,90
S 3	168750	168750	0,00
S 4	167250	167250	0,00
S 5	178500	166500	6,72
$\bar{X}$	168300	165600	1,60

Tab. 19

ATP-induzierter Thrombozytenformwandel in den Konzentrationen 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}.

ATP 10^{-6}	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	97	95	81	56
S 2	100	96	89	50
S 3	98	95	85	57
S 4	97	95	85	56
S 5	100	97	86	55
$\bar{X}$	98,4	95,6	85,2	54,8
S	1,52	0,89	2,86	2,77

Tab. 20

ATP 10^{-7}	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	58	55	31	19
S 2	55	46	33	12
S 3	55	50	31	15
S 4	57	48	30	17
S 5	58	55	30	15
$\bar{X}$	56,6	50,8	31,0	15,6
S	1,52	4,09	1,22	2,61

Tab. 21

ATP 10^{-8}	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	35	15	13	8
S 2	30	20	13	10
S 3	28	17	14	10
S 4	35	15	14	12
S 5	33	16	13	10
$\bar{X}$	32,2	16,6	13,4	10.0
S	3,11	2,07	0,55	1,41

Tab. 22

Leerwert zu den Tab. 19 - 21 .

	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	25	22	18	10
S 2	27	20	17	11
S 3	30	25	22	14
S 4	29	20	17	12
S 5	25	22	16	10
$\bar{X}$	27,2	21,8	18,0	11,4
S	2,28	2,05	2,35	1,67

Tab. 23

ADP-induzierter Thrombozytenformwandel in den Konzentrationen 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}.

ADP 10^{-6}	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	99	99	84	59
S 2	100	99	86	55
S 3	100	98	80	50
S 4	99	97	85	56
S 5	100	98	85	56
$\bar{X}$	99,6	98,2	84,0	55,2
S	0,55	0,84	2,35	3,27

Tab. 24

ADP 10^{-7}	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	99	93	56	30
S 2	100	98	50	29
S 3	98	95	50	31
S 4	99	93	54	30
S 5	97	93	55	28
$\bar{X}$	98,6	94,4	53,0	29,6
S	1,14	2,19	2,83	1,14

Tab. 25

ADP 10^{-8}	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	52	32	21	15
S 2	56	35	24	12
S 3	58	37	26	12
S 4	51	36	19	15
S 5	52	31	24	14
$\bar{X}$	53,8	33,0	22,8	13,6
S	3,03	2,92	2,77	1,52

Tab. 26

Leerwert zu den Tabellen 23 - 25

	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	25	22	18	10
S 2	27	20	17	11
S 3	30	25	22	14
S 4	29	20	17	12
S 5	25	22	16	10
$\bar{X}$	27,2	21,8	18,0	11,4
S	2,28	2,05	2,35	1,67

Tab.27

Median-Werte der Volumenverteilung bei ATP-induziertem Thrombozytenformwandel in den Konzentrationen 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}.

ATP 10^{-6}	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	162.83	162.44	154.70	152.17
S 2	165.13	164.86	158.55	154.83
S 3	164.17	163.87	160.72	149.69
S 4	162.49	159.90	154.99	151.25
S 5	158.49	158.15	154.30	148.44
$\bar{X}$	162.62	161.84	156.65	151.28
S	2,54	2,76	2,84	2,45

Tab.28

ATP 10^{-7}	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	154.03	151.89	148.80	150.16
S 2	153.64	153.36	149.38	149.53
S 3	153.85	157.38	152.44	149.48
S 4	150.53	152.38	144.53	146.01
S 5	149.11	149.56	143.38	144.67
$\bar{X}$	152.23	152.91	147.71	147.97
S	2,26	2,86	3,72	2,46

Tab.29

ATP 10^{-8}	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	149.10	147.97	147.96	147.58
S 2	150.95	150.50	149.54	150.05
S 3	151.53	150.89	147.29	147.88
S 4	148.92	146.87	146.60	145.33
S 5	145.18	140.68	143.93	145.05
$\bar{X}$	149.14	147.38	147.06	147.18
S	2,49	4,11	2,06	2,05

Tab.30

Leerwert zu den Tabellen 27 - 29

	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	151.15	155.29	150.57	159.21
S 2	152.49	152.21	151.97	149.76
S 3	152.01	157.48	155.54	153.89
S 4	150.43	152.23	151.45	157.12
S 5	148.46	147.89	146.34	145.18
$\bar{X}$	149.70	150.36	150.50	150.86
S	2,09	2,74	2,79	3,35

Tab.31

Median-Werte der Volumenverteilung bei ADP-induziertem Thrombozytenformwandel in den Konzentrationen 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}.

ADP 10^{-6}	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	158.64	159.91	158.70	152.38
S 2	166.12	163.13	158.87	154.30
S 3	166.22	162.59	159.82	153.99
S 4	156.51	157.23	155.20	150.53
S 5	161.66	160.45	154.35	149.13
$\bar{X}$	161.83	160.60	157.39	152.07
S	4,36	2,36	2,44	2,22

Tab.32

ADP 10^{-7}	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	162.89	161.06	153.04	144.15
S 2	164.36	158.03	151.30	154.54
S 3	163.41	163.20	154.86	152.17
S 4	160.99	156.97	149.24	148.19
S 5	159.01	153.06	148.85	150.30
$\bar{X}$	162.13	158.46	151.46	149.87
S	2,13	3,90	2,54	3,96

Tab.33

ADP 10^{-8}	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	154.64	150.87	148.21	149.58
S 2	152.21	151.39	149.63	150.19
S 3	157.14	154.04	152.03	149.52
S 4	151.41	148.12	146.79	146.99
S 5	149.23	147.35	147.11	147.60
$\bar{X}$	151.40	150.35	149.55	149.29
S	3,70	2,69	2,44	2,13

Tab. 34

Leerwert zu den Tabellen 31 - 33

	1 Min.	5 Min.	15 Min.	30 Min.
S 1	151.15	155.29	150.57	159.21
S 2	152.49	152.21	151.97	149.76
S 3	152.01	157.48	155.54	153.89
S 4	150.43	152.23	151.45	157.12
S 5	148.46	147.89	146.34	145.18
$\bar{X}$	149.70	150.36	150.50	150.86
S	2,09	2,74	2,79	3,35

Herrn Professor Dr. med. K. Breddin danke ich für die Überlassung des Themas:

DER EINFLUSS VON APYRASE AUF DIE HAF-INDUZIERTEN THROMBOZYTENSTIMULATION.

und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit.
Weiterhin danke ich Herrn Dr. med. C. Kirchmaier und Frau G. Mosch für ihre wertvollen Hinweise und Ratschläge.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich,daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität,Frankfurt am Main, zur Promotiosprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

DER EINFLUSS VON APYRASE AUF DIE HAF-INDUZIERTE THROMBOZYTENSTIMULATION

in der Abteilung für Angiologie des Zentrums der Inneren Medizin unter Leitung von Herrn Professor Dr. med. K. Breddin ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen ,als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner anderen in-und ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Riedstadt, den 20.5.1984

Udo Uellmann

Lebenslauf

Udo Lehmann, geb. am 19. September 1945
in Pfaffengrün/Kreis Tepl

1952	- 1956	Volksschule, Seligenstadt
1956	- 1960	Mittelschule, Seligenstadt
1960	- 1963	Goldschmiedelehre, Hanau
1966	- 1967	Bundeswehr
1970	- 1972	Kursus und Prüfung zum Goldschmiedemeister
Mai	1976	Abitur, Abendgymnasium, Offenbach
Oktober	1976	Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
September	1977	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
April	1979	Zahnärztliche Vorprüfung
	1982	Zahnärztliche Prüfung
	1982	Bestallung als Zahnarzt

Riedstadt, den 20.05.1984

Udo Lehmann